

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 101–108

Ein neues Verfahren zur Herstellung linearer Polyacrylamidgradienten

Von K. Lorentz und Barbara Flatter

Aus der I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Hochschule Lübeck

(Eingegangen am 10. Juni/8. November 1976)

Zusammenfassung: Lineare Konzentrationsgradienten verbessern die elektrophoretische Trennung in Polyacrylamidgelen. Sie entstehen durch Überlagerung gleicher Teile konzentrierter und verdünnter Monomerlösung (180–260 bzw. 23–50 g/l Acrylamid) in Gelröhrchen, die um 3–10° gegenüber der Waagerechten geneigt sind, und so anschließend, bis zur homogenen Mischung der berührenden Teile beider Ansätze, um ihre Längsachsen rotiert werden. Darauf polymerisiert man in senkrechter Stellung. Der dichtere Anteil enthält 4-Nitrophenol, so daß die Polymerkonzentration pro Gelsegment densitometrisch zu bestimmen ist.

Aufbau und Gebrauch der Drehvorrichtung sind einfach und liefern gut reproduzierbare Ergebnisse. Das vielseitige Verfahren eignet sich auch für die Trennung von Lipoproteinen und Enzymen und liefert bei gleichzeitiger Anwendung eines pH-Gradienten 27–30 Proteinfractionen im Serum.

A new method for the preparation of linear polyacrylamide gradients

Summary: Continuous linear gradients improve electrophoretic separations in polyacrylamide. They are obtained by overlaying equal volumes of two monomer solutions with different acrylamide concentrations, namely 180–260 and 23–50 g/l, in the usual gel tubes. The tubes are tilted 3–10° to the horizontal, and rotated around their longitudinal axis until the parts of both solutions in contact are mixed homogeneously. Subsequent polymerization takes place in the vertical position. The more concentrated lower solution contains 4-nitrophenol, so that the final polymer concentration at any point of the gel can be measured densitometrically.

The construction and handling of the rotation device are simple and yield highly reproducible results. This versatile method was evaluated for the separation of proteins, lipoproteins, and enzymes in human serum and yields 27–30 protein fractions by additional use of a pH-gradient.

Einführung

Wegen ihres höheren Molekülsiebeecktes trennen kontinuierliche Gradienten aus Polyacrylamid bei der Elektrophorese Proteingemische prinzipiell besser als Gele einheitlicher Porengröße (1, 2). Ihre Herstellung erfordert jedoch eine Mischapparatur (2, 3) mit entsprechendem Mehrbedarf an Reagenzien, oder sie beschränkt sich auf Mikromethoden (4). Anderenfalls müssen Fertiggele invariabler Zusammensetzung (5, 6) benutzt werden. Daher enthält diese Mitteilung ein einfaches Verfahren zum Ansatz linearer Gelgradienten beliebiger Konzentration und Steilheit.

Material und Methoden

Geräte

Wir polymerisieren die Gele in 85 mm langen Röhrchen aus Duranglas mit einem Innendurchmesser von 4,8 mm und führen alle Trennungen mit der Apparatur „Standard-PAA“

(Biomol, Ilvesheim) durch. Fabrikate mit zylindrischen Einsätzen für Gelröhrchen (z. B. Boskamp, Pleuger, WTW) sind möglicherweise besser geeignet, da sie durch Einsetzen einer zentralen Achse die Verwendung der nachstehend beschriebenen Vorrichtung erübrigen. Sie besteht aus zwei, etwa 2 mm dicken Scheiben Polycarbonat (Makrolon) oder Polymethacrylat (Plexiglas), die man übereinanderlegt, zentral durchbohrt und kreisförmig mit 6–12 Löchern, deren Größe dem äußeren Durchmesser der Röhrchen entspricht, versieht. Ihr Abstand voneinander und vom Zentrum hat keinen Einfluß auf die Ausbildung des Gelgradienten. Man stanzt sie am besten mit einem heißen Korkbohrer als circular angeordnete Reihe einander berührender Halbkreise. Dann schiebt man die beiden (z. B. sternförmig gezackten) Scheiben, 40–60 mm voneinander entfernt, direkt auf einen Glas- oder Metallstab, der als Achse eines Rührmotors (z. B. Heidolph) dient, oder man klebt sie zuvor auf die Enden eines abgeschnittenen Polycarbonat- oder Polyethylenröhrchens (Abb. 1), die dazu mit Tetrahydrofuran benetzt wurden. Dabei ist die absolut deckungsgleiche Anordnung der Löcher entscheidend, um eine exakt achsenparallele Ausrichtung der Röhrchen zu sichern (Abb. 2).

Die Form des Gradienten läßt sich bei 405 nm densitometrisch mittels Pherogrammauswerter 2602, Photometer Eppendorf 1101 M und Kompensationsschreiber 4412 (sämtlich von Netheler & Hinz, Hamburg) aufzeichnen. Die Zymogramme

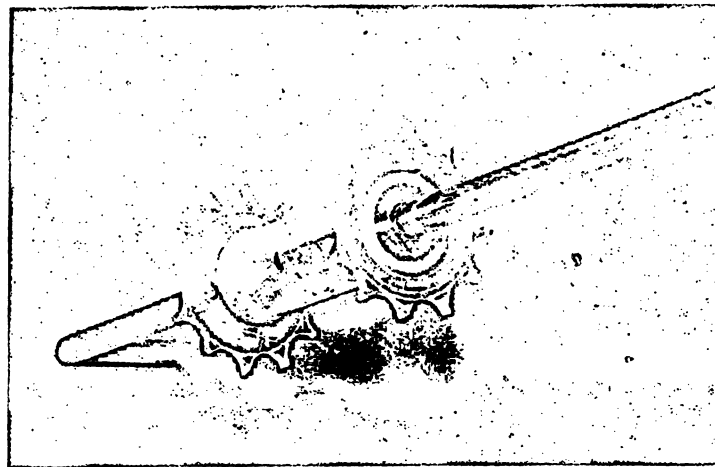


Abb. 1. Träger zur Herstellung zylindrischer Gradientengele in Rotationsstellung.

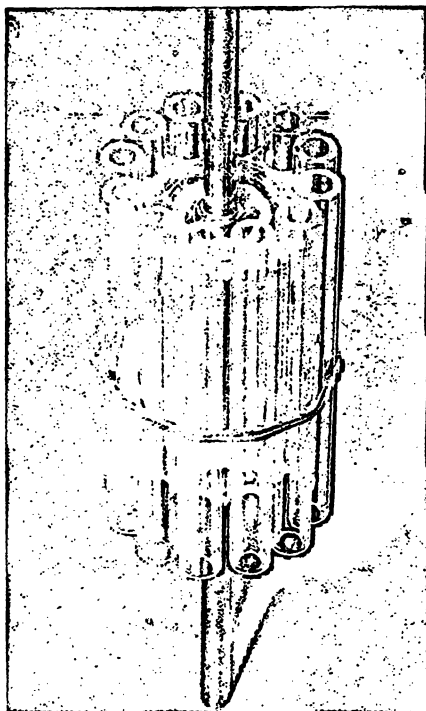


Abb. 2. Vorrichtung mit Röhrchen in Polymerisationsposition.

und Proteinphorogramme kann man mit der Kombination Spektralphotometer PMQ 3, Disc-Ansatz ZK 4 (beide von Zeiß, Oberkochen) und Schreiber Servogor S (Metrawatt, Nürnberg) auswerten.

Reagenzien

Zur Identifizierung der Serumproteine dienen M- und LC-Partigen Immunodiffusionsplatten der Behringwerke AG (Frankfurt/M.). Farbstoffe bezogen wir von Serva (Heidelberg) und Chroma (Stuttgart). Alle anderen Reagenzien lieferte E. Merck (Darmstadt) in bestmöglicher Qualität. Acrylamid wurde in Chloroform, Methylenbisacrylamid in Aceton umkristallisiert. Wir setzten alle Lösungen, wenn nicht anders vermerkt, mit demineralisiertem Wasser an.

Die in der Folge beschriebenen Ansätze erwiesen sich nach Vorversuchen als bestgeeignet für die Fraktionierung von Serum-

proteinen. Sie können zur Trennung anderer Proteingemische verändert werden, doch sollte das molare Verhältnis von Acrylamid zu BIS¹⁾ immer 75:1 betragen, und die Totalkonzentration beider darf 32 g/l nicht unterschreiten, damit klare elastische Gele von ausreichender Festigkeit entstehen. Auch das äquimolare Verhältnis der Katalysatoren und deren absolute Konzentration sind als optimal anzusehen.

Elektrodenpuffer (Tris 45,5 mmol/l, Glycin 192 mmol/l, pH 8,6, Ionenstärke 0,118): 5,5 g Tris und 14,4 g Glycin auf 1000 ml lösen.

Gelpuffer (Tris 1,5 mol/l, Schwefelsäure 100 mmol/l, pH 8,6): 182 g Tris in etwa 800 ml Wasser mit 100 ml Schwefelsäure 1 mol/l auf pH 8,6 einstellen und ad 1000 ml auffüllen.

Katalysator 1 (Temed 30 mmol/l, Tris 1,5 mol/l, Schwefelsäure 100 mmol/l, pH 8,6): 4,5 ml Temed mit Gelpuffer auf 1000 ml verdünnen.

Katalysator 2 (Ammoniumperoxodisulfat 30 mmol/l): 680 mg $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ auf 100 ml lösen.

Monomer A (Acrylamid 5,49 mol/l, BIS 73 mmol/l, Kaliumhexacyanoferrat (III) 300 $\mu\text{mol/l}$): 390 g Acrylamid, 11,2 g BIS und 100 mg $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ad 1000 ml lösen.

Monomer B (Acrylamid 845 mmol/l, BIS 11 mmol/l, Kaliumhexacyanoferrat (III) 334 $\mu\text{mol/l}$): 60 g Acrylamid, 1,72 g BIS und 110 mg $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ auf 1000 ml lösen.

Katalysator 2 nur 8 h, übrige Lösungen 5 d bei 4 °C haltbar.

4-Nitrophenol (7,19 mmol/l in Methanol 1,72 mol/l): 100 mg 4-Nitrophenol in 10 ml Methanol lösen und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml verdünnen.

Zur Gelbereitung jeweils 1 Tl. Katalysator 1 und 2 mit 3 Tln. Monomer A oder B mischen. Dem Ansatz A (234 g Acrylamid/l) werden 100–120 μl Nitrophenollösung auf 10 ml zur Markierung zugesetzt.

Bromphenolblau (14,9 mmol/l = 10 g/l Ethanol).

Färbelösung (Amidoschwarz 10 B 8,1 mmol/l, 5-Sulfosalicylsäure 590 mmol/l, Methanol 4,93 mol/l): 5 g Amidoschwarz, 150 g Sulfosalicylsäure (Dihydrat) und 200 ml Methanol ad 1000 ml auffüllen und filtrieren.

Essigsäure (1,75 mol/l) – **Methanol** (6,2 mol/l): 100 ml Essigsäure und 250 ml Methanol ad 1000 ml verdünnen.

Dichlordimethylsilan (415 mmol/l = 50 ml/l Benzol).

Tritonlösung (Triton X-100 5 g/l).

¹⁾ Benutzte Abkürzungen:

BIS N, N'-Methylenbisacrylamid

Temed N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin

Tl(e) Volumenteil(e)

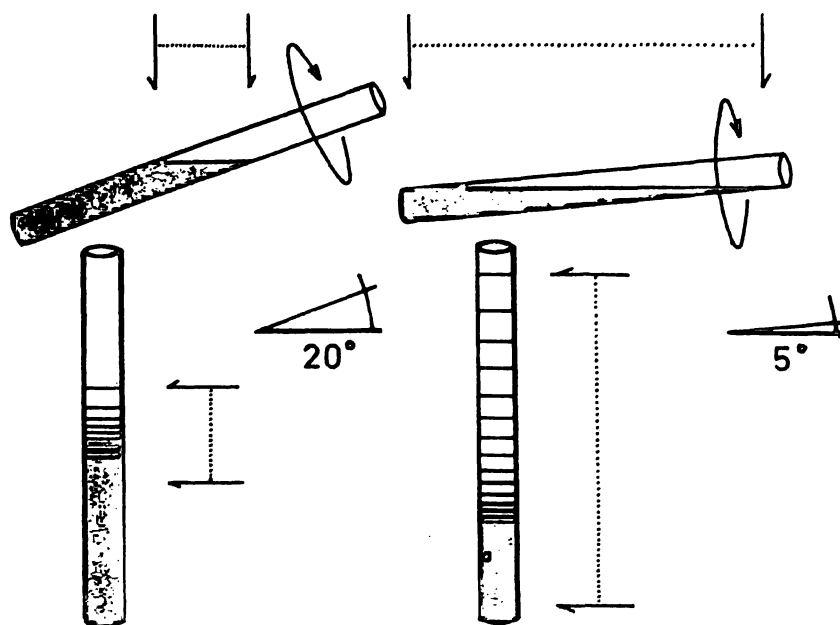


Abb. 3. Entstehung linearer Gelgradienten durch Rotation unterschiedlich dichter Ansätze bei 5° bzw. 20° Neigung mit Polymerisation in der Senkrechten. Der Abstand zwischen den Pfeilen bezeichnet die Länge des Gradienten.

Methoden

Die mit Chromschwefelsäure und Aceton gereinigten Röhren werden in Dichlordimethylsilan getaucht, bei 60 °C getrocknet (7) und mit Gummiringen senkrecht in die Drehvorrichtung gespannt (Abb. 2). Man füllt sie wegen der minimalen Wandhaftung aus einer Spritze mittels Kanüle oder Polyethylen-schlauch jeweils aufsteigend 38 mm hoch nacheinander mit den Ansätzen A (d_4^{20} 1,015) und B (d_4^{20} 1,008). Dann neigt man die Achse auf 5° oder 10° gegenüber der Horizontalen und wartet 1 min. Die Silanisierung erlaubt auch bei dieser Neigung eine einwandfreie Überlagerung beider Gemischungen (Abb. 3). Anschließend wird 10 min mit 54 U/min gedreht, wodurch eine homogene Mischung beider Ansätze im Verhältnis ihrer in der Querschnittsebene des Röhrens bewegten Volumina eintritt. Dadurch bildet sich ein kontinuierlicher, nach Neigungswinkel unterschiedlich langer, Gradient aus. Infolge der nach abwärts zunehmenden Dichte bleibt er in senkrechter Stellung, in der nicht rotiert wird, stabil (Abb. 3). Die Röhren werden dann, zur Ableitung der Polymerisationswärme aus dem dichten Gel, etwa 70 mm tief in Wasser von Raumtemperatur eingetaucht (Becherglas mit Rührmagnet). Wegen der geringen Monomerkonzentration im oberen Gel ist eine Übersichtung mit Wasser überflüssig, doch sollten die Gele wie bei Mikroverfahren (4) noch 4 bis 24 h verschlossen bei Raumtemperatur lagern.

Um die Totalkonzentration (g/l) an Polyacrylamid für jeden Abschnitt des Gradienten zu berechnen, legt man mit den verwendeten Monomeren einmalig eine Standardgerade an. Dazu mischt man wechselnde, aber komplementäre Volumina der Ansätze A und B und polymerisiert sie in Röhren, die gegen ein Röhren mit Gel B (hier Polyacrylamid-Gesamtkonzentration 37 g/l = $A_{405 \text{ nm}}$ 0,000) oder gegen Luft photometriert werden. Die der Absorption von 4-Nitrophenol entsprechende Polymerkonzentration berechnet man aus den Anteilen von A und B im Gemisch (Tab. 1). Diese Werte lassen sich in jede Densitometrie-Kurve übertragen. Hierzu wird das weitporige Ende des Gels mit dem Photogrammauswerter (Blende $3 \times 0,5 \text{ mm}$) wie oben auf $A = 0,000$ eingestellt. Am Kompensationsschreiber wählt man zum Vorschub des Auswerter von 25 mm/min die Papiergeschwindigkeit $v = 50 \text{ mm/min}$ und den Bereich $A_{0-1,0} = 200 \text{ mm}$, so daß sich bei Zunahme der Polyacrylamid-Gesamtkonzentration um 20 g/l (etwa 20 mm) pro 10 mm Gel eine Steigung der Absorptionsgeraden um 45° ergibt (Abb. 4).

Zur Proteinfractionierung werden 3 µl, zur Darstellung von Lipiden und Enzymen 5–20 µl Serum aufgesetzt. Bei Magensaft

Tab. 1. Ansatz, Totalkonzentration und Absorption verschiedener Gele bei Lagerung nach Abschluß der Polymerisation. Messungen gegen Luft, $n = 11$ Werte pro Röhren.

Tle.	A	B	Polyacrylamid-Gesamtkonzentration [g/l]	A 405 nm		2 h	3 h	12 h
				\bar{x}	s	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
–	4	–	37,0	0,058	0,002	0,058	0,058	0,057
1	3	–	87,9	0,290	0,006	0,288	0,286	0,281
2	2	–	138,9	0,512	0,010	0,509	0,504	0,496
3	1	–	189,8	0,756	0,020	0,750	0,743	0,734
4	–	–	240,7	0,997	0,018	0,985	0,978	0,965

gibt man 50 µl unter Zusatz von etwas Saccharose in Substanz oder besser 5 µl einer auf 0,1 TL, bei Liquor 5 µl einer auf 0,02 Tle. des Ausgangsvolumens eingegengten Probe auf. Nach Markieren des Kathodenpuffers mit 20–50 µl Bromphenolblau-Lösung wird 2 h mit 30 V, dann etwa 18 h mit 50 V getrennt. Da nach dieser Zeit die Fraktionen praktisch nicht mehr wandern, entfernt man die Gele anschließend durch Anspülen mit der Tritonlösung mittels Spritze und dünner Kanüle vom Kathodischen Ende bis zur markierten Albuminbande. Die gelockerten Gele lassen sich darauf leicht mit einer Pipettierhilfe (Brand, Wertheim) oder einem Peleusball ausdrücken. Sie werden durch die Farblösung in 1 h gleichzeitig fixiert und gefärbt. Um eine Volumenänderung zu verhindern, entfärbt man unter wiederholtem Wechsel der Lösung in Essigsäure-Methanol, sonst in Essigsäure 70 g/l.

Die Lipoproteine des Serums werden nach Allen (8) mit Sudan-schwarz vorgefärbt, in einem Gradientengel 23,4–234 g/l getrennt, und zur Auswertung im Röhren belassen. Für Magensaft- und Liquorproben verwendet man, bei Konstanz der übrigen Parameter, besser einen flachen Gradienten von 50–216 g/l. Lactatdehydrogenase wird nach Dietz & Lubrano (9), Esterase durch 30 min Inkubation bei 25 °C in 100 mmol/l Phosphat pH 7,0 mit Essigsäure-3-indoly-lester 100 µmol/l oder Naphthyl-2-acetat 4,3 mmol/l und Echtblausalz 10 B 1 g/l nachgewiesen. Alkalische Phosphatase und Arylamidase werden nach Fraktionierung in Tris (165 mmol/l) – Borat (11,5 mmol/l) – Elektrodenpuffer (pH 8,6) in üblicher Weise dargestellt (10, 11). – Außerdem verglichen wir die beschriebene Anfärbung

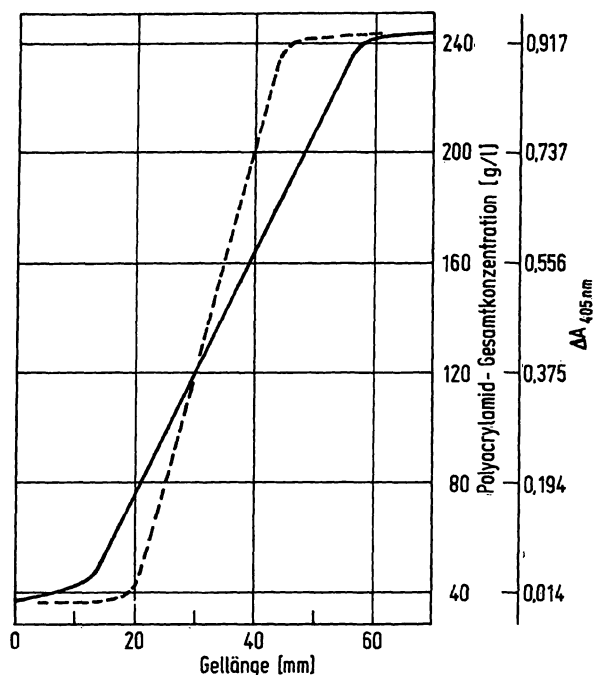


Abb. 4. Densitogramme von Gradientengelen in Duranglasröhrchen 85 x 4,8 mm bei 5° (—) und 10° (---) Rotationswinkel 3 h nach abgeschlossener Polymerisation. Abszisse: Gellänge (10 mm = 20 mm Papier-vorschub), Ordinate: $A_{0-1,0} = 200$ mm (20 g/l Polyacrylamid-Gesamtkonzentration 20 mm), s. Methoden.

der Proteine mit anderen Verfahren wie Uniblu nach *Datnyer & Finnimore* (12), Coomassie Brilliantblau R 250 (13), Säureviolett 4 BL bzw. 6 B (14) und Ponceau S (beide in Methanol-Sulfosalicylsäure) und identifizierten die Fraktionen durch Segmentieren ungefärbter Gele. Die 1 mm dicken Scheibchen wurden mit 155 mmol/l Natriumchlorid zerrieben und auf Partigenplatten gebracht.

Ergebnisse

Reproduzierbarkeit und Form der Gelgradienten

Die Prüfung des Verfahrens und seiner Bedingungen setzte einen Indikator für die Geldichte mit folgenden Eigenschaften voraus:

1. hohe anodische Beweglichkeit (negative Ladung), um das Gel vor den Proteinen und Bromphenolblau zu passieren,
2. hoher molarer Absorptionskoeffizient in einem Bereich des Spektrums, der nicht durch die Lichtabsorption der Gelmatrix beeinflusst wird,
3. fehlende Interferenz mit den Reaktanten und maximale Resistenz gegen Oxidation und Wärme bei der Polymerisation und
4. ausreichende Stabilität bei der Lagerung der Gele vor dem Trennvorgang.

4-Nitrophenol erfüllte diese Bedingungen weitaus besser als eine Reihe von Azofarbstoffen (Amidoschwarz 10B,

Neucoccin, Chromotrop 2R). Die drei zuerst genannten Eigenschaften wurden bei der Elektrophorese und durch Photometrie bzw. Messung der Polymerisationszeit beurteilt, die letzte durch Densitometrie. Wir registrierten die Absorption der zum Anlegen der Standardkurve hergestellten Gelröhrchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Polymerisation (Tab. 1). Bei linearer Abhängigkeit von A_{405} gegenüber der Polyacrylamid-Gesamtkonzentration ergab sich eine Abnahme der Absorption von maximal 3% nach 3 h bzw. 4,5%, wenn man das ΔA gegenüber Gel B (A minus 0,058) zugrunde legte. Aufgrund dieser Daten wurde regelmäßig 3 h nach Abschluß der Polymerisation densitometriert, da bei weiterem Zuwarten durch Diffusion im feuchten Gel eine Abflachung des unteren und oberen Wendepunktes (Abb. 4) und damit eine optische Verkürzung des linearen Abschnitts eintrat. Unter den genannten Bedingungen variierte die Steigung dieses Teils bei 12 Röhrchen derselben Präparation nur minimal und erreichte selbst bei 10 verschiedenen Einstellungen von 5° Neigung der Rotationsachse nur 5% Abweichung (Tab. 2). Dieser Winkel lieferte die besten Resultate. Länge, Anstieg, Form und Reproduzierbarkeit der Absorptionsgeraden hingen wesentlich von der lichten Weite und deren Toleranz bei verschiedenen Röhrchen ab. Bei Maximaldifferenzen zwischen 4,75 und 4,80 mm, die einer Streuung von etwas über 1% entspricht, überschritt der aus den Standardabweichungen von Tabelle 1 errechnete VK der Absorptionen nicht 2,7%.

Wurde mit 54 U/min gearbeitet, so veränderten sich Länge und Anstieg des Gradienten nicht zwischen 5 und 15 min Rotationsdauer, doch wurde erst nach 7–8 min eine ruhige Linie des Schreibers als Anzeichen homogener Mischung erreicht. Bei Vorgabe einer konstanten Rotationsperiode von 10 min erhielten wir zwischen 45 und 65 U/min identische Ergebnisse. Entscheidend war hierfür die 1 min lange Ruhestellung des geeigneten Röhrchens vor dem Drehen, um eine einwandfreie Überlagerung der Ansätze zu garantieren. Nach der Rotation reichte die Schwerkraft zur Ausrichtung der Gelschichten quer zur senkrechten Röhrchenachse aus, da die Polymerisation erst 24–30 min nach der Gelbereitung einsetzte. Sie begann wegen der nach oben zunehmenden Cyanoferratkonzentration im dichten Gel und schloß nach 30–40 min makroskopisch ab, so daß 12 Röhrchen ohne nachteilige Polymerisationsverzögerung gleichzeitig präpariert werden konnten. Da sich die analytischen Eigenschaften (Auflösung, Untergrundentfärbung, unterdrückte Bandenkrümmung) im weitporigen Gel durch Lagerung besserten, fand offenbar eine Nachpolymerisation statt. Da das Gemisch A vor B bereitet wurde, trat die Reaktionswärme nicht gleichzeitig im gesamten Gel auf, so daß Konvektionsströmungen gering blieben. Die resultierende geringe Schlierenbildung, bei Luftkühlung gelegentlich zu beobachten, ließ sich durch Eintauchen der Röhrchen in etwa 20 °C warmes Wasser unterdrücken, während Eiswasser ein

partielles Ablösen der Gelzylinder vom Röhrchen verursachte und damit zu Störungen bei der Densitometrie führte oder bei zu frühem Eintauchen die Polymerisation verzögerte.

Analytische Variable

Für die Auftrennung von Serumproteinen mußte die minimale Polyacrylamid-Konzentration unter 40 g/l liegen, um Makroglobuline in das Gel eintreten zu lassen. Dabei erwiesen sich, beurteilt nach Anzahl und Schärfe der Banden, ein Rotationswinkel von 5° und der benutzte Konzentrationsgradient von 1:6,5 als besonders geeignet. Eine Erhöhung der Endkonzentration auf 263,6 g/l (Gradient 1:7) schärfte die Fraktionen vor dem Albumin, verminderte aber die Auflösung im weitporigen Anteil. Denselben Effekt führte beim beschriebenen System die Verlängerung des Ansatzes B, z. B. auf 42 mm, herbei. Während eine Erhöhung der Polyacrylamidkonzentration über 250 g/l für Seren unnötig und mit einer verlängerten Laufzeit verbunden war, ließ sich die Trennschärfe im kathodischen Bereich durch einen pH-Gradienten entscheidend verbessern (Abb. 5). Dazu stellten wir bei sonst gleicher Zusammensetzung den Gelpuffer für Ansatz B mit Schwefelsäure auf pH 7,4

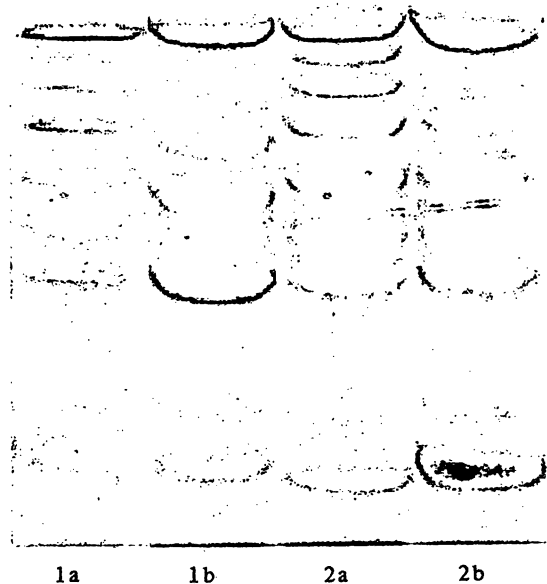


Abb. 5. Proteinphorogramme von 2 Seren in Gradientengelen mit *Ornstein-Davis*- (Pos. a) und *Allen*-System (b) bei vierfacher Vergrößerung des weitporigen Anteils (3 µl Serum, Amidoschwarz, Rotationswinkel 5° , oben Kathode).

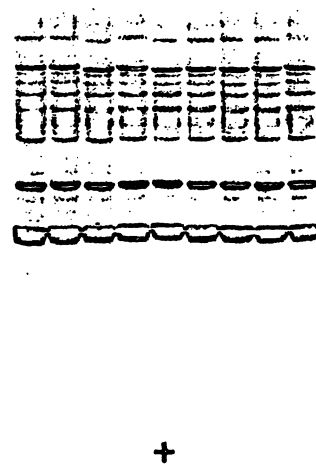


Abb. 6. Proteinphorogramme in Gradientengelen derselben Präparation (3 µl Serum, Amidoschwarz, *Ornstein-Davis*-System, Rotationswinkel 5°).

ein. Bei einem Rotationswinkel von 5° ließen sich mit diesem System (Polyacrylamid-Gesamtkonzentration 37,0–240,7 g/l, pH 7,4–8,6) in Seren 27–30 Proteinbanden trennen (Abb. 6). Für die Darstellung von Lipoproteinen und Enzymen genügten Gradientengele mit einem konstanten pH-Wert (Abb. 7).

Eine Verminderung der Tris-Konzentration im Gelpuffer von 1,5 auf 0,5 mol/l verkürzte zwar die Trenndauer und beschleunigte die Fixierung der Gele, doch nahm die Trennschärfe durch Verbreiterung der Banden ab. Auch die empfohlene Zugabe von Hydantoin 50 mmol/l (15) oder Harnstoff 170 mmol/l Ansatz beschleunigte in allen Systemen die kathodischen Fraktionen und verschlechterte damit die Auflösung im Bereich der Haptoglobine. Ähnliche Nachteile resultierten aus Vorläufen mit 50 V über 2 h zur Entfernung von Persulfat. Dagegen beeinträchtigte Triton X-100 bis zu 10 g/l weder die Polymerisation noch die Trennleistung, doch ließ es schon ab 100 mg/l die Gele während der Elektrophorese aus den Röhrchen treten. Daher wurde es nur mit 10 mg/l den Ansätzen zugefügt, wenn hochvernetzte Gele (über 250 g/l) aus den Röhrchen gepreßt werden mußten.

Auch die Natur des Gegenions beeinflusste bei gleichem pH-Wert von 8,6 und identischer Tris-Konzentration (165 mmol/l) des Elektrodenpuffers die Trennung im Gradientengel: EDTA (verminderte Trennschärfe und verzögerte Wanderung aller Fraktionen), Borat



Abb. 7. Pherogramme in Gradientengelen. Die Positionen 2, 4, 6 und 8 enthalten die Gele in Röhren. Von links nach rechts: Lactatdehydrogenase-Zymogramm (mit Albuminbande), Proteinpherogramm, Arylamidase (m. A.), Lipo-pherogramm (m. A.), alkalische Phosphatase, Magensaft, Esterase (Indoxylacetat, m. A.), Liquor, Esterase (Naphthylacetat, m. A.), sämtlich in 5°-Gelen.

(schlechtere Fraktionierung im kathodischen Gelabschnitt) und Glycylglycin (ungenügende anodische Auflösung) waren Glycin eindeutig unterlegen. Dasselbe galt auch für den bei Mikroverfahren empfohlenen Puffer Tris 50 mmol/l – Glycin 384 mmol/l pH 8,4 (4). Andere Puffer wurden nicht getestet.

Während die Konzentration des Elektrodenpuffers und sein pH-Wert dem erreichbaren Optimum entsprachen, konnten wir die Trennbedingungen mangels Gegenkühlung nicht variieren. Dagegen bedeutete das Serum-

volumen von 3 μ l den bestmöglichen Kompromiß zwischen Nachweisgrenze und Bandenkrümmung, wobei eine Verdünnung der Probe mit Laufpuffer oder Saccharose 1 mol/l nicht erforderlich war. Schließlich wählten wir nach einem Vergleich verschiedener Färbungen das beschriebene Verfahren aus folgenden Gründen: Die Verwendung von Coomassie Brilliantblau R 250 nach *Chrambach et al.* (13) oder *Weber & Osborn* (16) erforderte eine vorangehende lange Fixierung und beeinträchtigte die Entfärbung des Hintergrundes. Beim Vorgehen nach *Dunker & Rueckert* (17) resultierte bei extrem langer Färbedauer eine gute Entfärbung, aber alle mit Coomassie behandelten Zylinder durften nicht in Entfärbelösung, sondern nur – unter Quellung – in Essigsäure aufbewahrt werden. Dagegen konnten wir mit Amidoschwarz, Ponceau und Säureviolett gleichzeitig färben und fixieren, die proteinfreie Gelmatrix farblos erhalten, und die Gele mindestens 6 Monate ohne Absorptionsverlust aufbewahren. Verkürzung der Färbezeit (auch bei Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C), Fortlassen von Sulfosalicylsäure oder Ersetzen durch Trichloressigsäure 1 mol/l verminderte die Schärfe der Banden. Uniblue, ein Vinylsulfonderivat des Remazolbrillantblau R, konnte mit denselben günstigen Eigenschaften wie Amidoschwarz verwendet und außerdem zur Nachfärbung bei anderen Nachweisen benutzt werden. Bei vergleichender Densitometrie (in den zugehörigen Absorptionsmaxima) der Anfärbung von 1–10 μ g Humanalbumin in 2 mm breiten Gelzonen lieferte Coomassie nur unterhalb von 2 μ g die höchsten Werte. Über 5 μ g lagen die Extinktionen mit den anderen Farbstoffen hingegen 2 bis 5 mal höher.

Pherogramme

Bei der gleichzeitigen Elektrophorese eines Normalserums in 12 Gelen derselben Herstellung (5° Neigungswinkel) variierte die Distanz der Albuminbande vom Start maximal zwischen 47 und 49 mm (Abb. 5), bei 10 Läufen mit 120 Gelen zwischen 47 und 51 mm, während die Länge der Gelzylinder nach der Entfärbung zwischen 74 und 76 mm betrug. Eine ähnlich gute Reproduzierbarkeit ergab sich auch für den Abstand Präalbumin – α_2 -

Tab. 2. Einfluß des Rotationswinkels auf die Eigenschaften von Gradientengelen mit 37,0–240,7 g/l Gesamtkonzentration an Polyacrylamid, pH 8,6 (Allen-System). Densitometrie, s. Methoden; Proteinpherogramme aus einem Poolserum (3 μ l, Amidoschwarz, Essigsäure-Methanol). Angabe von $\bar{x} \pm 2s$ bei 12 (gemeinsame Präparation) und 120 Gelen (10 Präparationen).

Untersuchte Parameter	Rotationswinkel der Röhren					
	3° 12	3° 120	5° 12	5° 120	10° 12	10° 120
Steigung der densitometrischen Absorptionsgeraden in °	46 \pm 2	46 \pm 5	61 \pm 1	61 \pm 3	76 \pm 1	76 \pm 2
Länge des linearen Gradienten in mm	62 \pm 5	62 \pm 8	43 \pm 3	43 \pm 7	22 \pm 2	22 \pm 3
Abstand Präalbumin – α_2 -Makroglobulin in mm	59 \pm 4	59 \pm 7	33 \pm 2	33 \pm 4	21 \pm 2	21 \pm 2
Anzahl der Fraktionen	17–18		20–22		20–22	
Trennschärfe (Auflösung)	befriedigend		gut		gut	

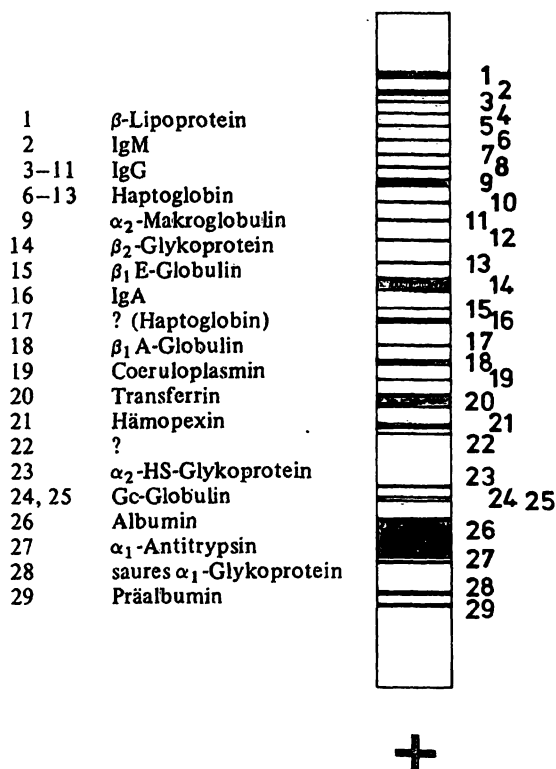


Abb. 8. Lage der wichtigsten Serumproteine im Gradientengel bei immunologischer Zuordnung. Polyacrylamid-Gesamtkonzentration 37–240,7 g/l, Rotationswinkel 5°, pH 7,4–8,6.

Makroglobulin (Tab. 2) und damit für die Lokalisation aller Fraktionen. Trotz Einsatz von 20 μ l Serum gelang uns keine vollständige Identifizierung, da nicht sämtliche Antiseren zur Verfügung standen. Die Reihenfolge der Banden war nach 16 h Trenndauer immer gut erkennbar und entsprach (Abb. 8) nahezu den Angaben von Hoffmeister (18).

Mit der gleichen Konstanz ließen sich Zymogramme erhalten. Bei störender Albuminmarkierung durch Bromphenolblau, z. B. beim Nachweis von Lactatdehydrogenase (Abb. 7) konnte es durch Fluorescein ersetzt werden (15). Zwei kathodisch gelegene Banden mit α -Amylaseaktivität stellten wir nach Davies (19) durch 12–16 h Inkubation in einer Suspension von Cibachronblau F3A-Stärke (Phadebas Amylase Test) dar. Dagegen mißlang der Nachweis von γ -Glutamyltransferase nach modifizierten (Glycylglycinpuffer, pH, Diazoniumverbindungen) und Originalmethoden für Folien (20) oder Agar (21). Verglichen mit normalen Verfahren waren die enzymaktiven Banden von Esterase, Arylamidase, alkalischer Phosphatase und Lactatdehydrogenase im Gradientengel deutlich schmaler (Abb. 7).

Diskussion

Gegenüber den üblichen Methoden zur Gradientengeltbereitung mit Apparaturen zur Füllung einzelner (22) oder mehrerer Rund- (23), Platten- (1, 2, 3, 24, 25) oder Mikrogele (26) verzichtete das angegebene Verfahren auf eine Polymerisationsverzögerung. Auch der Zusatz von Saccharose (2, 3), der über einen Viskositätsgradienten die Ferguson-Beziehung zwischen Molekulargewicht und Laufstrecke verändert (27), war entbehrlich. Damit entfielen auch technische Probleme, die nach Kapadia et al. (27) sonst bei der Herstellung reproduzierbarer Gelgradienten auftreten: Konvektionsströme und wechselnde Polymerisationsgeschwindigkeit als Folge der mit steigender Konzentration zunehmenden Reaktionswärme, eine geringe und im Verlauf des Gradienten unterschiedlich wirksame Polymerisation als Ergebnis verzögernder Bedingungen, verlängerter Zutritt von Licht und Sauerstoff zum Gelgemisch und Schwierigkeiten bei der Temperaturkontrolle. Andererseits erlaubte die Benutzung der Drehvorrichtung nur die Herstellung linearer Gradienten, während Mischapparate auch andere Gradienten erzeugen und in besonderen Fällen (25) die BIS-Konzentration zusätzlich zum variablen Acrylamidverhältnis verändern können.

Dagegen ermöglichte das Rotationsprinzip die Anwendung vieler Techniken. Vor allem ließ die optische Kontrolle des Gradienten durch einen stabilen anodisch wandernden Farbstoff die Polyacrylamidkonzentration in jedem Gelsegment bestimmen und nicht allein die Form des Gradienten, die auch mit ungeladenen Farbstoffen darzustellen ist (26), beurteilen. Dies gestattete, die spätere Position eines Proteins von bekanntem Molekulargewicht vorherzusagen und die erforderlichen Polyacrylamidkonzentrationen für alle Trennprobleme zu berechnen. Im Gegensatz zur Molekulargewichtsbestimmung, die man besser mit einem pH-kontinuierlichen System nach Allen durchführt (28), trennt man die Serumproteine mit einem zusätzlichen pH-Gradienten (analog Ornstein & Davis, 29) durch den Konzentrationseffekt im weitporigen Gel optimal. Obwohl bei der benutzten Laufzeit kein „dead stop“ der Fraktionen eintrat und ihre Reihenfolge nicht dem Verhältnis der Molekulargewichte entsprach, beeinflusste eine Veränderung der Trenndauer um ± 2 h die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht. Wir verzichteten daher auch auf eine systematische Untersuchung verschiedener pH-Gradienten, die sich mit Indikatorfarbstoffen darstellen und möglicherweise eine beschleunigte Fraktionierung zulassen.

Literatur

1. Slater, G. G. (1968), *Anal. Biochem.* 24, 215–217.
2. Margolis, J. & Kenrick, K. G. (1968), *Anal. Biochem.* 25, 347–362.
3. Margolis, J. & Kenrick, K. G. (1967), *Nature (London)* 214, 1334–1336.
4. Rüchel, R., Mesecke, S., Wolfrum, D. I. & Neuhoﬀ, V. (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1351–1368.
5. Polyacrylamide gradient gels PAA 4/30 (1974), Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden.
6. Gradipore Gels (1972), Gradients Pty. Ltd., Lane Cove, Australia.
7. Schwartz, A. N. & Zabin, B. A. (1966), *Anal. Biochem.* 14, 321–327.
8. Allen, R. C. (1974), in *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel* (Allen, R. C. & Maurer, H. R., eds.), p. 289, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York.
9. Dietz, A. A. & Lubrano, T. (1967), *Anal. Biochem.* 20, 246–257.
10. Lorentz, K., Flatter, B. & Heydrich, D. (1974), *diese Z.* 12, 81–86.
11. Lorentz, K., Marunowski, A. & Ritter, U. (1974), *diese Z.* 12, 468–473.
12. Datyner, A. & Finnimore, E. (1973), *Anal. Biochem.* 52, 45–55.
13. Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M. & Zaccari, J. (1967), *Anal. Biochem.* 20, 150–154.
14. Abraham, K., Schütt, K., Müller, I. & Hoffmeister, H. (1970), *diese Z.* 8, 92–98.
15. Neuhoﬀ, V. (1973), *Micromethods in Molecular Biology*, p. 14, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
16. Weber, K. & Osborn, M. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
17. Dunker, A. K. & Rueckert, R. R. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 5074–5080.
18. Hoffmeister, H. (1974), in *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel* (Allen, R. C. & Maurer, H. R., eds.), p. 266–278, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York.
19. Davies, T. J. (1972), *J. Clin. Pathol.* 25, 266–267.
20. Patel, S. & O'Gorman, P. (1973), *Clin. Chim. Acta* 49, 11–17.
21. Miyazaki, S. & Okumura, M. (1972), *Clin. Chim. Acta* 40, 193–197.
22. Kidby, D. K. (1970), *Anal. Biochem.* 34, 478–484.
23. Caton, J. E. & Goldstein, G. (1971), *Anal. Biochem.* 42, 14–20.
24. Margolis, J. (1969), *Anal. Biochem.* 27, 319–322.
25. Margolis, J. & Wrigley, C. W. (1975), *J. Chromatogr.* 106, 204–209.
26. Dames, E. & Maurer, H. R. (1974), in *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel* (Allen, R. C. & Maurer, H. R., eds.), p. 221–231, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York.
27. Kapadia, G., Chrambach, A. & Rodbard, D. (1974), in *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel* (Allen, R. C. & Maurer, H. R., eds.), p. 127–128, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York.
28. Lorentz, K. (1976), *Anal. Biochem.* 76, 214–220.
29. Maurer, H. R. (1971), *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, p. 22–32, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York.

Prof. Dr. K. Lorentz
Kronsfordter Allee 71/72
D-2400 Lübeck